

10/536901

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP2004/000086

09.02.04

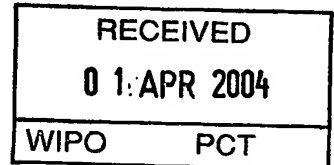
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 1月17日

出願番号
Application Number: 特願2003-045163
[ST. 10/C]: [JP2003-045163]

出願人
Applicant(s): 大西 靖彦

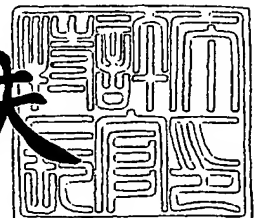


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 3月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3022344

【書類名】 特許願

【整理番号】 9999999999

【提出日】 平成15年 1月17日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 陽イオン性多糖類共重合体ベクター

【請求項の数】 2

【発明者】

 【住所又は居所】 愛知県瀬戸市小空町 3 9 番地の 4

 【氏名】 大西 靖彦

【特許出願人】

 【識別番号】 592256782

 【住所又は居所】 愛知県瀬戸市小空町 3 9 番地の 4

 【氏名又は名称】 大西 靖彦

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 要約書 1

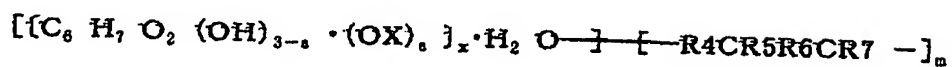
【書類名】 明細書

【発明の名称】 陽イオン性多糖類共重合体ベクター

【特許請求の範囲】

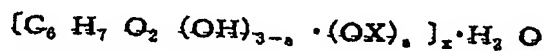
【請求項 1】 一般式

【化 1】



において、水可溶性リニア多糖類の陽イオン性誘導体の単位の式は、

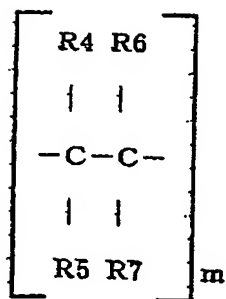
【化 2】



〔式中Xは、 $-(CH_2)_nR_1$ (R_1 は $-NH_3^+$ 、 $-NH^+(CH_3)_2$ 、 $-NH^+(C_2H_5)_2$ 、 $-N^+(CH_2)_2CH_2CH(OH)CH_3$ 、 $-N^+(C_2H_5)_2(C_2H_5)N(C_2H_5)_2$ 、 $-N^+(C_2H_5)_2CH_2CH(OH)CH_3$ 、 $-N^+(C_2H_5)_3$ 、 $-C_6H_4 \cdot NH_3^+$ 、 $-CO_m \cdot C_6H_4 \cdot NH_3^+$ よりなる群から選ばれた基、 $n=1 \sim 3$ の整数)、又は $-COR_2$ (R_2 は $-CH_2 \cdot NH_3^+$ 又は $-C_6H_4 \cdot NH_3^+$) 又は $-CH_2CH(OH) \cdot CH_2R_3$ (R_3 は $-NH_3^+$ 、 $-NH^+(CH_3)_2$ 、 $-NH^+(C_2H_5)_2$ 、 $-N^+(C_2H_5)_3$ からなる群から選ばれた基) 又は $-NH \cdot CH_2 \cdot CH_2$ 、 a は $0 < a < 3$ の正数、 x は $50, 000 \geq x \geq 5$ の整数〕

で表され、式中オレフィン化合物の重合体の単位の式は、

【化3】



(ここでR4、R5とR6はそれぞれ水素原子又はCH₃

O

||

より選ばれる、R7は-C-O-R8 (R8はここで水素原子、C₁~C₁₂のアルキル基、シクロヘキシル基、C₁~C₄低級アルキル置換シクロヘキシル基、C₁~C₈のヒドロキシアルキル基、C₁~C₈のアミノアルキル基、C₁~C₈のジアルキルアミノアルキル基、グリシジル基、テトラヒドロフラン基、C₁~C₄の低級アルキル置換テトラヒドロフラン基、ベンジル基及び(-CH₂-C(H)₂-O-)_yCH₂CH₂OH基(ただしyは1~10の正数)、-N(R₉)₂ (R₉は水素原子又はC₁~C₄のアルキル基、2つのR₉は同じでも異なってもよい)、

O

||

O

||

又R7は-C-CN、-OH、-O-C-R10

(R10はC₁~C₈のアルキル基)、フェニル基、ピリジン基、トリル基、ピロリドン基及びC₁~C₄低級アルキル置換ピロリドン基を示し、mは20から200,000の正の整数で表わされる。]

で表され、水可溶性リニア多糖類の陽イオン性誘導体を幹ポリマーとし、オレフィン化合物がグラフト鎖として成る、グラフト率が2%から5000%の範囲の(化2)とこの(化3)よりなる、上記(化1)で表わされる、リニア多糖類を母体とする多糖類の陽イオン性部分置換体にオレフィン単量体をグラフトして得られる共重合体と核酸(DNA、RNA)よりなる複合体。

【請求項2】一般式

【化 1】

において、水可溶性リニア多糖類の陽イオン性誘導体の単位の様式は、

【化 2】

で表され、式中オレフィン化合物の重合体の単位の様式は、

【化 3】

で表され、水可溶性リニア多糖類の陽イオン性誘導体を幹ポリマーとし、オレフィン化合物がグラフト鎖として成る、グラフト率が 2 % から 5 0 0 0 % の範囲の (化 2) とこの (化 3) よりなる、上記 (化 1) で表わされる、水可溶性リニア多糖類を母体とする多糖類の陽イオン性部分置換体にオレフィン単量体をグラフトして得られる共重合体よりなる遺伝子組み替えベクター。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【産業上の利用分野】

本願発明の水可溶性リニア多糖類の陽イオン性誘導体ーオレフィン単量体グラフト共重合体は水酸基を有する水可溶性リニア多糖類の陽イオン性誘導体に水中下オレフィン単量体をグラフト重合させ、遺伝子組み替えベクター材料として有用なラテックス重合生成物を製造するものである。本発明は水酸基を有するリニア多糖類の陽イオン性誘導体で水可溶性であれば、統べて水中下オレフィン単量体をグラフト重合させ、遺伝子組み替えベクター材料として有用なラテックス重合生成物を製造出来る事を示唆するものである。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

ある遺伝子を他の生物へ移植する際にその遺伝子を運ぶ、いわば運びやが必要でありこれをベクターと称している。現在ベクターとして使用されている物は各種のウイルスであり、細菌に寄生するプラスミドや細菌に感染するファージである。これらに移植する遺伝子にくっ付けて感染させれば細菌に遺伝子を送りこめ。現在実用化されているベクターはこれらウイルスベクターであるが、使用するウイルス自体の形質が細胞に移植する際に組み込まれる恐れがあり、安全性に疑問が指摘されている。一方従来イムノアッセイ材料としてラテックス重合生成物を

製造されていたが、製造する方法は界面活性剤存在下水溶液中で乳化重合して成された物が大部分であり、界面活性剤の存在しないソープレスの物が望まれている。これは水溶液中に存在する界面活性剤がラテックス診断薬としての作用に影響するからである。この為に問題点を解決するための手段として水可溶性リニア多糖類の陽イオン性誘導体－オレフィン単量体グラフト共重合体は水酸基を有する水可溶性リニア多糖類の陽イオン性誘導体に水中下オレフィン単量体を懸濁重合法や乳化重合法でグラフト重合させ、イムノアッセイ材料として有用なラテックス重合生成物を製造される。すでに水可溶性リニア多糖類の陽イオン性誘導体－オレフィン単量体グラフト共重合体ラテックスおよびラテックス診断薬の特許が成立している。これは抗体吸着ラテックス診断薬に使用されている。乳化重合とは水溶液中にオレフィン単量体を懸濁し通常は界面活性剤などを用いて乳化される重合法で、詳細に述べれば単量体あるいは成長鎖と水素結合、クーロン力、電荷移動相互作用、ファンデルワールス力などによって水溶媒界面で相互作用して高分子鎖が重合成長して水溶液中に微粒子を形成さす重合方法である。通常は重合生成物は重合させた単量体と界面活性剤との混合物として存在する。この不純物として考えられる界面活性剤はラテックス診断薬に使用される時に妨害する事があり問題と成っていた。今回、おもいもかけずこの技術を用いて遺伝子組み替えベクター材料として有用なラテックス重合生成物を製造出来る事をみいだした。

【0003】

【問題点を解決するための手段】

遺伝子工学で、ある遺伝子を他の生物へ移植する際にその遺伝子を運ぶ、いわば運びやが必要でありこれをベクターと称している。

現在ベクターとして使用されている物は各種のウイルスであり、細菌に寄生するプラスミドや細菌に感染するファージである。これらに移植する遺伝子にくっ付けて感染させれば細菌に遺伝子を送りこめる。このプラスミドやファージの替りに陽イオン性高分子体と核酸（DNA、RNA）との複合体をもちいると複合体のRNA、DNA（遺伝子）が直接にあらかじめ準備された細胞に送りこめる事に成る。この非ウイルス性ベクターを用いると危険性のあるウイルス類のベク

ターと異なり安全にかつ人工物である事から安定して使用される事になる。更に重要な事は癌治療にこの遺伝子治療を用いる場合、現在マクロファージへの遺伝子DNA導入がこのDEAEデキストランなどの陽イオン性高分子体のみが有効である事である。しかしRNA、DNA導入率はいまだかなり低く、実用にはさらなるハードルを越えねばならない。この遺伝子治療は個々のマクロファージを用いるテイラーメイド治療法であり癌治療に安全かつもつとも有効な治療法と考えられる。陽イオン性高分子体 としては陽イオン性多糖類が有望であるが、それは複合体が細胞膜をとおり抜ける事が必要であるからであり、この可能性は細胞膜表面の多糖類と複合体との相互作用にかかっているからである。ベクターとしての細胞膜の透過選択性にかんして高分子生体親和性は重要である。さらに生体親和性を付与するには、用いる陽イオン性高分子体のベクターは疎水親水ドメインを有する事が必要であり、具体的にはDEAEデキストランなどの陽イオン性多糖類とビニル単量体の共重合体からなるラテックスを形成し、ビニル単量体の重合部分による疎水部分と陽イオン性多糖類による親水部分をあわせ持たす事が重要である。即ちこの生じる疎水親水ドメインを有する複合体ラテックスの生体適合性が重要であり、陽イオン性多糖類とビニル単量体の共重合体にする事で陽イオン性多糖類のベクターとしての低DNA、低RNA導入率を改善できる事を発見した。

【0004】

【発明の効果】

本願発明は水酸基を有する水可溶性リニア多糖類の陽イオン性誘導体に水中下オレフィン単量体をグラフト重合させた物である。対するオレフィン単量体成長鎖や生じた共重合体鎖の構造はそれぞれ化学構造式(化2)、(化1)として記載されている。それぞれの結合関係は、水可溶性リニア多糖類の陽イオン性誘導体の水酸基の水素原子(開始剤の酸化によりプロトンとして)の引き抜きによるラジカル発生に起因するオレフィン単量体二重結合の連鎖移動による共有結合であることは明白である。これは4価のセリウムイオンなどを開始剤として用いて行い、一切の界面活性剤を使用しない事から抗体吸着ラテックス診断薬などに使用される時に妨害される事が無く大変有用であった。本願発明の水可溶性リニア多

糖類の陽イオン性誘導体ーオレフィン単量体グラフト共重合体ラテックスが抗体吸着ラテックス診断薬に使用されることを目的としている事は昭和59年特許願第248476号の特許請求の範囲の記載形式より明白であった。即ち水酸基を有する水可溶性高分子体に水中でオレフィン単量体をグラフト重合させ、イムノアッセイ診断材料として有用なラテックス重合生成物を製造する事を発明の構成に欠く事ができない事項の主要部としており、多糖類等のオレフィン単量体グラフト共重合体も同一の目的を達成出来る。このようなソープフリーと言われる溶媒と溶質との界面で成長するグラフト共重合体は種々用途の広い有用な物質である。特にイムノアッセイ材料以外にも濾過膜やバイオマテリアルとして注目されている。又その親水性に注目して、人口腎臓膜、コンポーネント、代用血管、コンタクトレンズへの応用が考えられてきたが、このラテックス重合生成物が生じる疎水親水ドメインの界面活生性が細胞膜表面の親和性・透過性に特に重要であり、今回は新たに非ウイルス性ベクターとして極めて有望な事が解った。

【0005】

【発明の構成の詳細な説明】

以下、この発明のリニア多糖類の陽イオン性誘導体ーオレフィン単量体グラフト共重合体について、詳細に説明する。リニア多糖類の陽イオン性誘導体ーオレフィン単量体グラフト共重合体は、次の2つのステップを経て得る。この重合体は核酸と複合体を形成して、細胞内の核に取りこまれ細胞の形質変換を生じるものである。

I リニア多糖類の陽イオン性誘導体の調整

固体で存在する場合、リニア多糖類の陽イオン性誘導体の単位の式が、

【化4】



〔式中Xは、 $-(CH_2)_nR1$ ($R1$ は $-NH_2$ 、 $-N(CH_3)_2$ 、 $-N(C_2H_5)_2$ 、 $-N^+(C_2H_5)_3$ 、 $-N^+(C_2H_5)_2(C_2H_5)N(C_2H_5)_2$ 、 $-C_6H_4 \cdot NH_2$ 、 $-CO \cdot C_6H_4 \cdot NH_2$ よりなる群から選ばれた基、 $n=1 \sim 3$ の整数)、又は $-COR2$ ($R2$ は $-CH_2 \cdot NH_2$ 又は $-C_6H_4 \cdot NH_2$) 又は $-CH_2CH(OH) \cdot CH_2R3$ ($R3$ は $-NH_2$ 、 $-N(CH_3)_2$ 、 $-N(C_2H_5)_2$ 、 $-N^+(C_2H_5)_3$ からなる群から選ばれた基)、又は $-NH \cdot CH_2 \cdot CH_2$ 、 a は $0 < a < 3$ の正数、 x は $50,000 \geq x \geq 5$ の整数〕

で示される。このリニア多糖類の陽イオン性誘導体の水酸基が一部エーテル結合でカルボキシメチル基、硫酸エステル基など酸性基で置換されたもの、あるいはアルキル基で一部置換されたものに上記(化4)中のXに表示されるカチオン官能基が入ったものでもよい。通常これらのリニア多糖類の陽イオン性誘導体はリニア多糖類の水酸基とXC1で表される上記陽イオン置換基の塩素化合物とのアルカリ溶液中のショツテンバウマン反応で得られる。ここで言うリニア多糖類とはデキストラン、プルラン等発酵法により工業生産可能なものが考えられる。対するグラフト重合させられるオレフィン単量体としては、一般式が下記式で示されるものが考えられる。

【化3】

具体的に言うと、アクリル酸、メタアクリル酸のごとき α 、 β -不飽和酸のアルキルエステル、シクロヘキシルエステルのとき低級アルキル置換シクロヘキシルエステル、2-ヒドロキシエチルエステル、2-ヒドロキシプロピルエステル、2-ヒドロキシブチルエステル；アクリルアミド、メタクリルアミド、アクリルアミド、アクリル-もしくはメタクリル-ジメチルアミド、上記 α 、 β -不飽和酸のC1～C3のアミノアルキルエステル、C1～C3のジアルキルアミノアルキルエステル、グリシジルエステル、テトラヒドロフルフリルエステル、ベンジルエステル、ポリエチレングリコールモノエステル類；アクリロニトリル、メタアクリロニトリルのとき α 、 β -不飽和酸のニトリル基；ビニルアルコール、メチルビニルアルコール、ジメチルビニルアルコール；酢酸ビニル、プロピオン酸ビニル、ビニルブチレートのときビニルアルコール及びそのメチル置換ビニ

ルアルコールのC₁～C₃アルキルエステル；スチレン、ビニルトルエン；ビニルピロリドン；ビニルメチルピロリドンなどが考えられる。

II グラフト共重合体の調整

反応は通常水溶液中で行われる。すなわちリニア多糖類の陽イオン性誘導体の水溶液中、上記オレフィン単量体を加え、開始剤を添加して反応する。開始剤としては4価のセリウム塩、4価のマンガン塩、第二鉄塩－過酸化水素が通常用いられるが、他に過硫酸カリウム（KPS）、アゾビスイソブチルニトリル（AIBN）、過酸化ベンゾイル（BPO）等ラジカル開始剤も用いられる。反応温度は常温より80℃まで幅広く選択出来る。必要なら窒素置換して反応を続行させる事も行われる。それぞれの結合関係は、水可溶性リニア多糖類の陽イオン性誘導体のプロトンの引き抜きによるラジカル発生によるオレフィン単量体二重結合の連鎖移動による共有結合である。この反応では生成物はラテックスで生じる。このラテックス重合体は一般的には水、アルコール、又はアセトン、テトラヒドロフラン等有機溶媒に不溶であるがキヤスティング法などにより、容易に成膜出来る。あるいはアルコールなど不溶溶媒を過剰に加え沈殿として得た後、熱プレス法などにより容易に成型品を作る事が出来る。

上記目的の為に、グラフト重合体中、幹ポリマーとグラフトポリマーの比率あるいはその重合度比率は目的に合わせて種々選択用れる。グラフト重合はその重合率をグラフト率（％）で定められる。これは $\text{グラフト率（％）} = (\text{グラフト重合した単量体量} / \text{グラフト共重合体中の幹ポリマー量}) \times 100$ で定義される。本発明においてはオレフィン化合物がグラフト鎖として成り、グラフト率が2％から5000％の範囲が適当と考えられる。本願発明は水酸基を有する水可溶性リニア多糖類の陽イオン性誘導体に水中下オレフィン単量体をグラフト重合させた物である事は繰り返し述べているが、生じた共重合体鎖の構造は特許請求の範囲に化学構造式として記載されている様に（化2）式と（化3）式よりなる、（化1）式で表わされる。

それぞれの結合関係は、水可溶性リニア多糖類の陽イオン性誘導体の水酸基のプロトンの引き抜きによるラジカル発生によるオレフィン単量体二重結合の連鎖移動による共有結合である。

III陽イオン性多糖類共重合体と核酸 (DNA、RNA) との複合体
本発明の陽イオン性多糖類共重合体の陽イオン性部分と核酸 (DNA、RNA) のリン酸部分は静電的クーロン力により容易に結合してポリイオンコンプレックス (PIC) の陽イオン性多糖類共重合体-核酸複合体を生じる。

この複合体は細胞膜を透過し、エンドサイトーシスで細胞内に容易に導入されエンドソーム (輸送小胞体) に取り込まれる。複合体はさらにエンドソームから細胞室内へ放出され、核膜を透過して核に至り、複合体として核内へ集積する。最終的に核内で複合体から核酸 (DNA、RNA) が分離され、転写・遺伝子発現する。

IV陽イオン性多糖類共重合体ベクターによるトランスフェクション

1. トランスフェクションの1日前より被形質変換細胞を100mmシャーレ中で培養する。

被形質変換細胞の100mm培養シャーレ中細胞密度は 8×10^5 個を目安にする。

今回はCOS-1細胞 (SV40で形質転換されたアフリカ緑ザル腎細胞) をDMEM培地 (牛胎児血清を10%含む) を用い37℃、5%CO₂下で培養を行った。

2. 洗液の1×PBS (phosphate-buffered saline (Dulbecco & Vogt (1954))) を準備する。

この洗液の1×PBS液とDEAE-Dextran共重合体液等の陽イオン性多糖類共重合体液を37℃に加温する。

3. 10×PBS液を使用して、1×PBS液に希釈する。トランスフェクション液を次のような手順で準備する。

100mm培養シャーレを用いて、滅菌チューブ中に組み替えDNAとしてルシフェラーゼをコードしたプラスミド (pGL3-Control (プロメガ Promega Madison WI)) 20μgを1×PBS液で540μlに希釈する。そして陽イオン性多糖類共重合体液 (陽イオン性多糖類として10mg/ml) の28μlを加える。よく混ざるように滅菌チューブを指でたたくようにする。

4。被形質変換細胞のCOS-1細胞が存在する培養シャーレから培養液を除く、100mm培養シャーレでは被形質変換細胞を洗液の1×PBSの10mlで2回洗浄する。

5。3。で調整されたDNA-陽イオン性多糖類共重合体複合体液をこの被形質変換細胞に加える。よく行き渡るように培養シャーレでは被形質変換細胞をかきまぜる。

6。培養シャーレを37℃で30分間インキュベイトする。ときどき培養シャーレをゆらしてみる。

7。100mm培養シャーレでは成長培地 (DMEM培地) 6mlを培養シャーレに加える。培養シャーレを37℃で2時間30分間インキュベイトして、細胞毒性 (cytotoxicity) を発現させる。成長培地を取換え、さらに37℃で48-72時間インキュベイトする。

発現効率

COS-1細胞の形質変換の発現効率は組み込まれている発現ルシフェラーゼ活性によった。すなわちルシフェラーゼ アッセイ キット (luciferase assay kit (Promega Madison WI)) を使用し、ルミノメータ (Turner model TD-20e luminometer (Turner Designs, Sunnyvale, CA)) により、TLU値 (Turner light units (TLU)) を求め、DEAE-デキストラン (Mw 50万、窒素含量5%) のその値を1として各サンプルを比較した。

【0006】

【実施例】

実施例 1

平均分子量Mw 50万のデキストランを母体とした窒素含量5%のDEAE (ジエチルアミノエチル) デキストラン塩酸塩 2gを水50mlに溶解し、ついでメタノール5ml、メタクリル酸メチル (MMA) 8mlを加え、十分に反応溶液、反応容器中の空気を窒素ガスで置換した後よく攪拌しながら、溶存空気を窒素ガスで置換した0.1N硝酸15mlに溶かした硝酸第二セリウムアンモニウ

ムニトレイト 100 mg を加え反応を開始する。反応は 30℃ で 2 時間行いラテックスが生成する。反応終了は停止剤としてハイドロキノン 1% 溶液 3 ml を使用した。後、反応溶液を 3 倍量のメタノール中に注入し沈殿を得た。この沈殿を熱水で十分に洗浄し遠心分離後 50℃ で減圧乾燥し、ついで乾燥物をソックスレー抽出器に入れて 24 時間アセトン抽出を行い、DEAE (ジエチルアミノエチル) デキストラン-MMA 共重合体の塩酸塩 1.5 g を得た。

窒素含量 1.7% グラフト率 200%.

対 DEAE-デキストラン収率 25%

このものは、DEAE デキストラン塩酸塩の良溶媒である水にもポリメタクリル酸メチルの良溶媒であるアセトンにも溶けない。この物の赤外吸収スペクトルをみると、DEAE-デキストラン塩酸塩には見られないカルボニル基の吸収が 1730 cm^{-1} 付近にみられる。

実施例 2

実施例 1 と同様な反応を行った後、ラテックスの反応終了溶液をメタノール中に注入せず、水中で透析を行い未反応物及び開始剤を除去して、ホモポリマーの混ざった DEAE デキストラン-MMA 共重合体ラテックスを得た。

このものは遺伝子組み替えベクターとして有用でありテスト結果を示す。

テスト方法は発明の構成の詳細な説明の欄の IV の手順に従って行った、即ちベクターの効果をみる形質変換の発現効率は COS-1 細胞に組み込まれている発現ルジフェラーゼ活性によった。平均分子量 M_w 50 万のデキストランを母体とした窒素含量 5% の DEAE デキストラン塩酸塩の値を 1 として実施例 2 のサンプルを比較したところ、5 倍の発現ルシフェラーゼ活性が得られた。

実施例 3

平均分子量 M_w 20 万のプルランを母体とした窒素含量 4% の DEAE (ジエチルアミノエチル) -プルラン塩酸塩 4 g を水 80 ml に溶解し、ついでメタノール 10 ml、スチレン単量体 35 ml を加え、十分に反応溶液、反応容器中の空気を窒素ガスで置換した後よく攪拌しながら、溶存空気を窒素ガスで置換した 0.1 N 硝酸 30 ml に溶かした硝酸第二セリウムアンモニウムニトレイト 200 mg を加え反応を開始する。反応は室温で 1 時間行いラテックスが生成する。

反応終了は停止剤としてヒドロキノン 1% 溶液 3 ml を使用した。

後の精製及び乾燥工程は実施例 1 と同様に行い、DEAE (ジエチルアミノエチル) プルラン-スチレン共重合体の塩酸塩 7 g を得た。

窒素含量 0.92% グラフト率 350%

対 DEAE プルラン収率 38%

実施例 4

実施例 3 と同様な反応を行った後、ラテックスの反応終了溶液をメタノール中に注入せず、水中で透析を行い未反応物及び開始剤を除去して、DEAE プルラン-スチレン共重合体ラテックスを得た。このものは遺伝子組み替えベクターとして有用であった。実施例 2 のごとくこのもののラテックス溶液の発現ルシフェラーゼ活性は実施例 2 の DEAE デキストラン塩酸塩の値を 1 として 0.5 倍の発現ルシフェラーゼ活性が得られた。

実施例 5

平均分子量 M_w 4 万のデキストランを母体とした窒素含量 5% の AE (アミノエチル) デキストラン塩酸塩 4 g を水 90 ml に溶解し、ついでメタノール 5 ml、メタクリル酸ブチル 20 ml を加え、十分に反応溶液、反応容器中の空気を窒素ガスで置換した後よく攪拌しながら、溶存空気を窒素ガスで置換した 0.1 N 硝酸 15 ml に溶かした硝酸第二セリウムアンモニウムニトレイト 50 mg を加え反応を開始する。反応は室温で 30 分を行いラテックスが生成する。反応終了は停止剤としてヒドロキノン 1% 溶液 3 ml を使用した。後の精製及び乾燥工程は実施例 1 と同様に行い、AE (アミノエチル) デキストラン-メタクリル酸ブチル共重合体の塩酸塩 6 g を得た。

窒素含量 1.3% グラフト率 300% 対 AE-デキストラン収率 38%

このものは、AE デキストラン塩酸塩の良溶媒である水にもポリメタクリル酸ブチルの良溶媒であるアセトンにも溶けない。

実施例 6

実施例 5 と同様な反応を行った後、ラテックスの反応終了溶液をメタノール中に注入せず、水中で透析を行い未反応物及び開始剤を除去して、AE (アミノエチル) デキストラン-メタクリル酸ブチル共重合体ラテックスを得た。このものは

遺伝子組み替えベクターとして有用であった。実施例2のごとくこのもののラテックス溶液の発現ルシフェラーゼ活性は実施例2のDEAEデキストラン塩酸塩の値を1として1.5倍の発現ルシフェラーゼ活性が得られた。

実施例7

平均分子量 M_w 3万のプルランを母体とした窒素含量3%のHPTMA(2-ヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウム)プルラン塩酸塩4gを水100mlに溶解し、ついでアクリル酸メチル単量体30mlを加え、十分に反応溶液、反応容器中の空気を窒素ガスで置換した後よく攪拌しながら、溶存空気を窒素ガスで置換した0.1N硝酸20mlに溶かした硝酸第二セリウムアンモニウムニトレイト200mgを加え反応を開始する。反応は室温で1時間行いラテックスが生成する。反応終了は停止剤としてヒドロキノン1%溶液4mlを使用した。

後の精製及び乾燥工程は実施例1と同様に行い、HPTMA(2-ヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウム)プルラン-アクリル酸メチル共重合体の塩酸塩2gを得た。

窒素含量1.2%グラフト率150%

対HPTMAプルラン収率20%

実施例8

実施例7と同様な反応を行った後、水中で透析を行い未反応物及び開始剤を除去して、ホモポリマーの混ざったHPTMA(2-ヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウム)プルラン-アクリル酸メチル共重合体ラテックスを得た。このものは遺伝子組み替えベクターとして有用であった。実施例2のごとくこのもののラテックス溶液の発現ルシフェラーゼ活性は実施例2のDEAEデキストラン塩酸塩の値を1として1.0倍の発現ルシフェラーゼ活性が得られた。

【書類名】 要約書

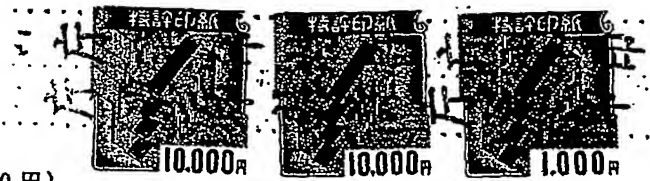
【要約】

【目的】 多糖類の陽イオン性誘導体を使用し水中下オレフィン化合物を重合させて無界面活性剤のラテックス溶液を調整し、DNA，RNAを細胞に送り込む非ウイルス性ベクターを得る。

【構成】 多糖類の陽イオン性誘導体に水中下オレフィン化合物を重合させてなる重合体から成るラテックス溶液。またこれに各種のDNA，RNAを反応させて得られる複合体。

【効果】 このような非ウイルス性ベクターを用いると危険性のあるウイルス類のベクターと異なり安全にかつ人工物である事から安定して使用される事になる。ベクターとしての形質変換効率を高める為に細胞膜の選択性は重要である。さらに形質変換効率を高める為には疎水親水ドメインを有する事が必要であり、具体的には陽イオン性多糖類とビニル単量体の共重合体材料からなるラテックスを形成さす事が重要である。本発明によりこの事が実証された。

【選択図】 なし



(21,000 円)

【書類名】 特許願

【整理番号】 A0000003-01

(B)20300100302

【提出日】 平成15年1月17日



【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 陽イオン性多糖類共重合体ベクター

【請求項の数】 2

【発明者】

【住所または居所】 愛知県瀬戸市小空町39番地の4

【氏名】 大西 靖彦

【特許出願人】

【識別番号】 592256782

【郵便番号】 489-0842

【住所又は居所】 愛知県瀬戸市小空町39番地の4

【氏名又は名称】 大西 靖彦



【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1



BEST AVAILABLE COPY

特願 2 0 0 3 - 0 4 5 1 6 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 2 2 5 6 7 8 2]

1. 変更年月日

1 9 9 2 年 1 0 月 3 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

愛知県瀬戸市小空町 3 9 番地の 4

氏 名

大西 靖彦